

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *in vitro*

Обзор

© 2019 В.К. Абдыев^{1*}, Э.Б. Дашинимаев^{2,3}, И.В. Неклюдова¹,
Е.А. Воротеяк^{1,2,3}, А.В. Васильев^{1,2}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Россия, Москва;
электронная почта: mailto:vepa@gmail.com

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
119334 Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский
университет им. Н.И. Пирогова, 117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.09.2018

После доработки 20.11.2018

Принята к публикации 20.11.2018

Первичные половые клетки (ППК) – уникальный тип стволовых клеток человека, способный дать начало тотипотентным стволовым клеткам и обеспечивающий фертильность организма и перенос генетической информации следующим поколениям. Исследования ППК являются важной областью биологии развития, в рамках которой проводится изучение фундаментальных проблем раннего эмбриогенеза, таких как механизмы обособления, эпигенетические перестройки и геномный импринтинг при дифференцировке ППК человека *in vitro*. На основе технологий получения ППК *in vitro* в перспективе возможна разработка новых способов лечения бесплодия и определение причин идиопатического бесплодия. С учетом этической специфики работы с эмбрионами человека основным методом исследования ППК человека является работа с клетками *in vitro*. В обзоре рассмотрены история вопроса исследований ППК человека *in vitro*, основные существующие модели и направления развития этой области.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: первичные половые клетки, ППК, ИПСК, ЭСК, VASA, PRDM1, человек.

DOI: 10.1134/S0320972519030047

Половые клетки являются уникальным типом клеток, который в результате процесса слияния способен дать начало тотипотентным стволовым клеткам. Когда и как в процессе развития половые клетки приобретают эту способность – один из важнейших вопросов биологии развития, который по-прежнему остается без ответа. Известно, что ППК у млекопитающих появляются в эпибласте предгастрюляционного периода. ППК у мышей образуются примерно на эмбриональной (E) стадии 6,25 суток развития (E6,25) из небольшой группы клеток эпи-

бласта, прилежащих к внезародышевой эктодерме и расположенных на дорсальной стороне эмбриона мыши (рис. 1) [1, 2]. Впервые эти клетки были обнаружены по экспрессии тканевой неспецифичной щелочной фосфатазы (TNAP) в основании аллантаоиса на стадии E7,0–7,5 [3–5]. С началом гастрюляционных движений у мыши такие клетки были обнаружены сначала в мезодерме первичной бороздки и далее в энтодерме [2, 3]. Попадая в заднюю кишку [5], ППК мигрируют по ней к передней части зародыша, пока не достигают мезонефральной почки, а затем по дорсальному мезентерию и через аорто-гонадо-мезонефральную область заселяют половые валики [6–8]. В дальнейшем именно клетки с высокой активностью щелочной фосфатазы, сформированные под аллантаоисом и мигрировавшие в зачаток гонады, превращаются в половые клетки, которые обеспечивают фертильность и перенос генома в следующее поколение.

Принятые сокращения: ППК – первичные половые клетки, чППК – первичные половые клетки человека, ПСК – плюрипотентные стволовые клетки, ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, ЭСК – эмбриональные стволовые клетки, чФГСК – фетальные гонадные стромальные клетки человека, BMP – костный морфогенетический белок, TNAP – тканевая неспецифичная щелочная фосфатаза, ЭТ – эмбриональные тельца.

* Адресат для корреспонденции.

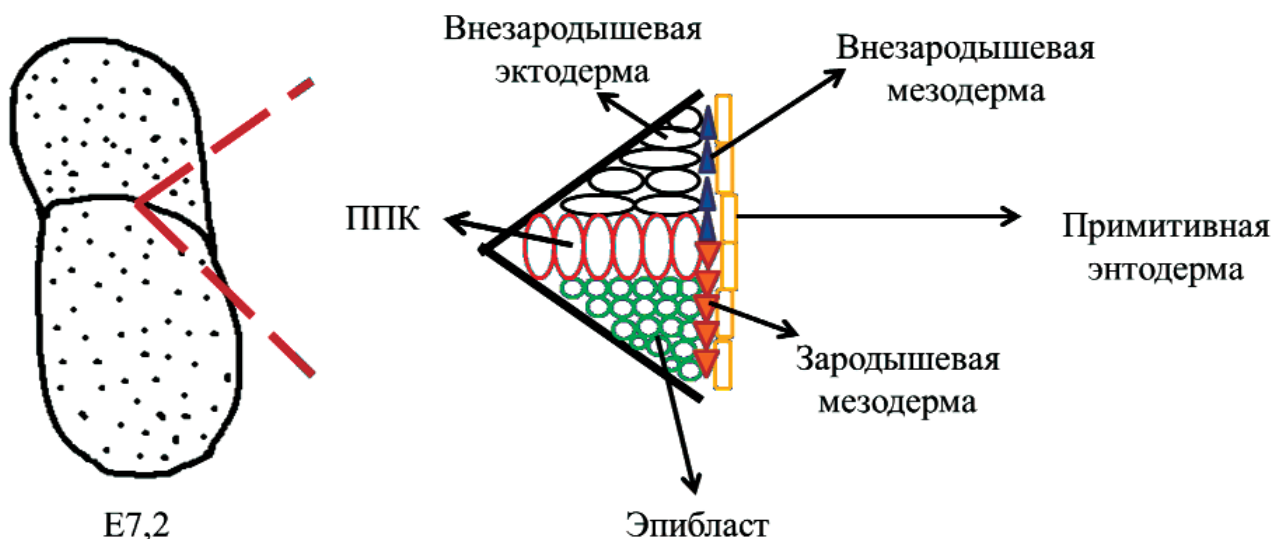


Рис. 1. Клеточное микроокружение ППК мыши на ранней стадии обособления.
С цветным вариантом рис. 1 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

У мыши предшественники ППК возникают в результате индукционного воздействия экстраэмбриональной эктодермы (через BMP4 и BMP8a; BMP – bone morphogenetic protein) [9–11] и висцеральной энтодермы (через BMP2) на клетки проксимального эпибласта [5, 12]. В ответ на индукционное воздействие окружающей ткани в шести клетках в постериально-проксимальном эпибласте (рис. 1) начинают экспрессироваться ранние маркерные гены ППК: *Prdm1*, *Fragilis*, *Tnap* и *Stella* [13, 14] (табл. 1). BMP-сигнальный путь воздействует через SMAD-каскад [11], в котором сигнальный медиатор SMAD4 из цитоплазмы смещается в ядро и активирует экспрессию регуляторного гена *Blimp1* в *Fragilis*-позитивных клетках постериально-проксимального эпибласта, которые контактируют с экстраэмбриональной эктодермой [5, 14]. В предшественниках ППК индуцируется экспрессия генов *Blimp1*, *Prdm14* и *Ifitm3* (*Fragilis*), являющихся маркерами ранних ППК [1, 6, 36]. Далее в период миграции (стадия E7) ППК пролиферируют, перемещаются вместе с клетками экстраэмбриональной мезодермы через формирующуюся первичную бороздку из основания аллантаоиса и образуют кластер, состоящий из ~40 клеток, экспрессируя при этом маркерные гены *Tnap* и *Stella*, а также *Cdh1* в энтодерму зачатка передней кишки эмбриона мыши [5, 6]. WNT3 играет важную опосредованную роль в формировании фенотипа ППК и, скорее всего, влияет на способность эпибласта индуцировать BMP-сигнальный путь [4]. При нокауте *Wnt3* у мутантных мышей на стадии E7,5 отсутствовали *Blimp1*-позитивные ППК [14]. *Wnt3* изначально экспрессируется в антериальном и постериаль-

ном эпибласте зародышевого цилиндра на стадии E6,25, но со временем экспрессия *Wnt3* наблюдается в постериально-проксимальном эпибласте и в будущей висцеральной энтодерме [37, 38].

ППК человека (чППК) были открыты двумя независимыми исследователями (Fuss и Felix) в 1912 г. и описаны как крупные клетки сферической формы, содержащие большое число гранул в цитоплазме [6]. ППК были обнаружены в стенке желточного мешка на стадии 13–20 сомитов. В дальнейшем ППК, продолжая пролиферировать, мигрируют из стенки желточного мешка в зачаток гонады. Следующие этапы идентификации чППК были связаны с открытием того, что ППК демонстрируют положительное окрашивание на гликогены (PAS-окрашивание) и TNAP [39]. Также в поисках маркеров чППК на фотографиях, полученных методом электронной микроскопии, была обнаружена специфическая структура Nuage, локализуемая перинуклеарно и выглядящая как сверхплотный объект [6, 40]. На данный момент функция этой структуры неизвестна, но в работах, изучавших ППК мыши, было выявлено, что Nuage вовлечена в процесс репрессии транспозонов посредством экспрессии специфических микроРНК, а также в поддержание сперматогенеза [41–43]. Невозможность экспериментальных исследований на эмбрионах человека и, как следствие отсутствие работ, изучающих ранние этапы развития ППК, не позволяют получить пространственно-временную характеристику процесса образования чППК *in vivo*. До сих пор полностью не расшифрованы механизмы индукционных процессов, влияющих на спецификацию и детерминацию чППК, но благодаря

Таблица 1. Ключевые факторы, вовлеченные в спецификацию и пролиферацию/жизнеспособность ППК

Маркер	Описание	Функция в ППК
1	2	3
Транскрипционные факторы (ТФ)		
OCT4	ТФ, содержащий ROU-гомеодомен	при подавлении гена, кодирующего OCT4, в ППК мышцы инициируется апоптоз, что приводит к ухудшению спецификации [15, 16]
NANOG	ТФ, содержащий гомеодомен	подавление гена, кодирующего NANOG, приводит к апоптозу ППК мышцы [17, 18] и снижению доли дифференцирующихся клеток в ППК мышцы <i>in vitro</i> [19]
PRDM14	ТФ, содержащий PR-домен и домен «цинковые пальцы»	подавление гена, кодирующего PRDM14, приводит к ухудшению спецификации ППК мышцы [20], т.е. угнетению экспрессии регуляторных генов ранних ППК и ПСК мышцы [21]. Повышенная экспрессия гена, кодирующего PRDM14, вызывает дефекты в пролиферации и дифференцировке ППК человека [22]
Tfap2c	ТФ, содержащий специфический ДНК-связывающий домен	подавление гена, кодирующего Tfap2c, приводит к ухудшению спецификации ППК мышцы [23]. Tfap2c регулирует активацию генов ППК или подавление генов соматических клеток в координации с PRDM1 и PRDM14 [24]
PRDM1 (BLIMP1)	ТФ, содержащий PR-домен и домен «цинковые пальцы»	подавление гена, кодирующего PRDM1, приводит к ухудшению спецификации ППК мышцы и снижению числа ППК в гетерозиготных мутантах [10, 25]
SOX17	ТФ суперсемейства Sox, содержащий ДНК-связывающий HMG-домен. SOX17 вовлечен в ингибирование Wnt-сигнального пути	подавление гена, кодирующего SOX17, приводит к репрессии <i>NANOG</i> и генов ППК человека (<i>PRDM1</i> , <i>NANOS3</i> , <i>TFAP2C</i> , <i>STELLA</i> , <i>KIT</i>) [26], в результате наблюдается полное отсутствие ППК
РНК-связывающие белки		
NANOS3	РНК-связывающий белок	подавление гена, кодирующего NANOS3, приводит к снижению числа ППК на стадии E8,5 и далее к полному отсутствию ППК мышцы [27, 28]
VASA (DDX4)	DEAD-бокс, содержащий РНК-хеликазу	подавление гена, кодирующего VASA, приводит к нарушению пролиферации мужских ППК после стадии E11,5 мыши [29]
DAZL	РНК-связывающий белок	сверхэкспрессия гена, кодирующего DAZL, подавляет трансляцию <i>OCT4</i> и влияет на экспрессию половых клеток, арест клеточного цикла и клеточной миграции в ППК человека [30]. Подавление гена, кодирующего DALZ, приводит к нарушению мейозного деления и полному отсутствию сперматозоидов [31]
Рецепторы		
cKIT (CD117)	рецептор с тирозинкиназной активностью	подавление гена, кодирующего cKIT, приводит к нарушению пролиферации и миграции ППК мышцы [32]
Поверхностные белки		
SSEA1	углеводная антигенная детерминанта гликолипида	нокаут гена, кодирующего α -1,3-фукозилтрансферазу 9 (<i>Fut9</i>), которая катализирует синтез эпитопов SSEA1, приводит к полному отсутствию SSEA1 у нокаутных мышей на ранних стадиях развития. Родившиеся <i>Fut9</i> -нокаутированные мыши развивались нормально и были фертильны [33]. SSEA1 не влияет на формирование и развитие ППК

1	2	3
FRAGILIS (IFITM3)	интерферон-индуцируемый трансмембранный белок 3	модулирует клеточную адгезию и влияет на дифференцировку. <i>Ifitm3</i> экспрессируется в мигрирующих ППК мыши [2]
Хроматин-связывающие белки		
DPPA3/STELLA/PGC7	ППК-специфический белок 7, вовлеченный в эпигенетическое репрограммирование хроматина зиготы	нокаутирование гена <i>Stella</i> приводит к пониженной фертильности самок из-за отсутствия материнского белка <i>Stella</i> . <i>Stella</i> -дефицитные эмбрионы мыши редко достигают бластоцисты и не имплантируются [34]. <i>Stella</i> играет важную роль в сохранении геномного импринтинга некоторых генов от деметилирования [35]

моделям на мышах и развивающейся области исследований плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) *in vitro* (для детального изучения можно обратиться к работам Mochizuki et al. [44] и Zhou et al. [45]) открываются возможности моделирования дифференцировки и развития чППК.

В ранних работах, изучавших чППК *in vitro*, использовали эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека, и эти исследования были направлены в основном на разработку методик получения и идентификации ППК [46–48]. При работе с чППК *in vitro* использовали многие данные, полученные на ППК мыши. Важным этапом в исследованиях чППК стало открытие того, что центральным индуцирующим фактором в детерминации чППК являются белки семейства BMP: BMP4, BMP7 и BMP8b [49]. Эксперименты по воздействию на ЭСК человека этими тремя факторами показали, что BMP4 играет ключевую роль в дифференцировке чППК *in vitro*, а BMP7 и BMP8b увеличивают число образующихся ППК [49]. В экспериментах с формированием эмбрионидных телец (ЭТ), полученных из ЭСК человека, и их спонтанной дифференцировкой добавление в культуральную среду рекомбинантного BMP4 увеличивало экспрессию специфических маркерных генов половых клеток – *VASA* и *SYCP3* [49]. В этой работе исследователи обратили внимание на то, что только небольшое количество клеток реагирует на индукцию BMP, и попытались объяснить это тем, что использование различных комбинаций разных рецепторов BMP на поверхности клеточной мембраны и сигнальных молекул в цитоплазме, по всей видимости, способствует дифференцировке клеток ЭТ в различных направлениях [49]. Возможно, только малая доля клеток изначально экспрессировала специфические для ППК рецепторы BMP в дифференцирующихся ЭТ. Надо отметить, что подобные *VASA*-позитив-

ные клетки обнаруживались в основном на периферии ЭТ, что может указывать на аналогию с образованием ППК в наружных слоях эпибласта [47, 49–51].

ППК из ПСК человека получают двумя основными методами: 1) совместным культивированием с соматическими клетками; 2) культивированием с использованием специальных протоколов (табл. 2).

Ниша играет важную роль в развитии и дифференцировке стволовых клеток. В связи с этим необходимо упомянуть о ряде работ по совместному культивированию ПСК с соматическими клетками с целью получения ППК. Совместное культивирование ЭСК человека с фетальными гонадными стромальными клетками человека (чФГСК), которые экспрессировали *СУР19* (маркер клеток Лейдига), показало, что эффективность дифференцировки ППК в этом случае увеличивается в 14–19 раз относительно контрольных групп (недифференцированных ПСК; ПСК, дифференцируемых только на матригеле; ПСК, культивируемых в кондиционированной чФГСК среде на матригеле) [52]. В случае же использования ИПСК вместо ЭСК в присутствии чФГСК доля ППК увеличивалась в 38–47 раз, что может быть связано с эпигенетическими различиями между ИПСК и ЭСК. Показано, что эффект увеличения доли ППК *in vitro* был напрямую связан с клеточными контактами между ПСК и чФГСК, а не с выделением растворимых факторов в среду. В исследовании не использовались факторы роста для индукции ППК [52]. В ряде работ было показано, что совместное культивирование мезенхимальных стволовых клеток, полученных из пупочного канатика, с клетками Сертоли мыши приводило к увеличению экспрессии *VASA*, *STELLA*, *DAZL* и других поздних гонадных маркерных генов [55], что подтверждает гипотезу о значительном эффекте микроокружения в дифференцировке ППК *in vitro*. Полученные в этих работах ре-

Таблица 2. Методы получения ППК из различных типов ПСК человека

Источник (тип ПСК)	Методы культивирования	Метод идентификации	Маркерные гены	Ссылка
ЭСК человека (HSF1, H9, HSF6), изолированные из внутренней клеточной массы бластоцисты	спонтанная дифференцировка путем формирования и 14-суточного культивирования эмбрионных телец (ЭТ)	–	<i>OCT4, NANOG, STELLAR, DAZL, VASA, cKIT, SYCP1, GDF9, SCP1, TEK1, PUM2</i>	[47]
ЭСК человека (H9, hES-NCL1)	индукция посредством BMP4, спонтанная дифференцировка, адгезивное культивирование и 16-суточное культивирование ЭТ	SSEA1-позитивная клеточная сортировка	<i>OCT4, NANOG, SSEA4, TRA-1-60, VASA, STELLA, SSEA1, cKIT, SCP1, SCP3</i>	[48]
ЭСК человека (HSF1, HSF6, H9) ИПСК человека	сокультивирование с фетальными гонадальными стромальными клетками человека	тройные маркеры ППК	<i>cKIT/SSEA1/VASA, PLAP/SSEA1/VASA, AMH, DPPA3, DAZL, SSEA4, PRDM1</i>	[52]
ИПСК человека, полученные из фибробластов взрослого организма и эмбриональных фибробластов	адгезивное культивирование с добавлением BMP4,7,8b; сверхэкспрессия генов <i>DAZL</i> и <i>BOULE</i> путем трансдукции	трансфекция GFP под промотором VASA	<i>OCT3/4, NANOG, VASA, STELLAR, DAZL, SCP3, ACR</i> (акрозин)	[53]
ЭСК человека (ES, HS306) ИПСК человека (KiPSCs, CBiPSCs)	адгезивное культивирование; индукция дифференцировки добавлением ретиноевой кислоты, факторов роста (bFGF, Forskolin – FRSK) и ингибиторов (rLIF, CYP26i)	сортировка клеток CD9 ⁺ /CD49 ⁺ /CD90 ⁻ /SSEA4 ⁻	<i>OCT4, SOX2, NANOG, SSEA3, SSEA4, TRA-1-80, VASA, SSEA1, CD9, CD49f, CD90, SCP3, γH2AX, ACR</i> (акрозин), <i>VIM</i> (виментин, маркер клеток Сертоли), <i>NES</i> (нестин) и <i>3b-HSD</i> (маркеры клеток Лейдига)	[54]
ЭСК человека (WIS2, WIBR3, LIS1) ИПСК человека (FX71.1 – линия ИПСК, полученная от пациента мужского пола с синдромом ломки X-хромосомы)	культивирование с цитокинами, ингибиторами и факторами роста путем формирования ЭТ в течение 8 дней; добавление в среду BMP2 и BMP4	трансфекция векторной конструкцией mCherry-NANOS3; сортировка с использованием двойных маркеров: NANOS3-mCherry/TNAP ⁺ и NANOS3-mCherry/CD38 ⁺	<i>OCT4, SOX2, NANOG, SOX17, PRDM14, PRDM1, cKIT, NANOS3, STELLA, TNAP, TFAP2C, CD38</i>	[26]

зультаты можно объяснить гетерогенностью культуры ПСК и присутствием в ней клеток, уже коммитированных к образованию половых клеток, и тем, что добавление соматических клеток гонад поддерживает процесс их дифференцировки и способствует появлению экспрессии указанных маркеров.

Самыми сложными проблемами при получении ППК *in vitro* являются идентификация и выделение чистой культуры ППК. В ранних работах *in vivo* ППК идентифицировали по активности щелочной фосфатазы и характеризовали по морфологическим признакам [56, 57]. В настоящее время считается, что самым специфичным маркером гонацитов является белок VASA,

относящийся к семейству РНК-хеликаз. Экспрессия гена *VASA* важна для развития половых клеток, и он впервые был идентифицирован у *Drosophila melanogaster*, но, как впоследствии выяснилось, функционирует у большинства беспозвоночных и позвоночных животных, а также человека. VASA является маркером мигрирующих и заселяющихся в гонады ППК в процессе развития человека и считается поздним маркером первичных гонацитов (поздних ППК). Ген *VASA* экспрессируется на разных стадиях развития половых клеток человека, в т.ч. в сперматозоидах и зрелых ооцитах, и не экспрессируется в соматических клетках [58], что позволяет использовать его для идентификации первичных

гоноцитов. Белок VASA впервые обнаруживается в мезенхиме половых желез на 7-й неделе развития человека и локализуется в основном в цитоплазме [58, 59]. Park et al. для идентификации и изолирования первичных гоноцитов человека разработали систему тройных маркеров: cKIT/SSEA1/VASA и PLAP/SSEA1/VASA. В I триместре развития плода человека все мигрирующие и заселяющие гонады ППК демонстрируют положительное окрашивание по этим тройным маркерам *in vivo*. В культурах с дифференцирующимися в ППК ЭСК и ИПСК человека получены похожие результаты [52]. Маркеры cKIT (он же CD117), PLAP и SSEA1 являются общими поверхностными белками-маркерами клеток в I триместре развития плода человека [52, 60, 61]. При спонтанной дифференцировке ЭСК в ЭТ в ряде исследований наблюдалось увеличение уровней экспрессии маркерных генов зрелых половых клеток, таких как *DPPA3 (STELLA)*, *DAZL*, *VASA*, *BOL*, *SCP1*, *SCP3*, *GDF9* и *TEKT1* [47, 55, 62–64]. Имеются данные, говорящие о том, что белок PRDM1 (он же BLIMP1) появляется на ранней стадии развития гонад человека и способствует детерминации судьбы ППК путем супрессии дифференцировки в соматические клетки [26, 62, 65, 66]. Также при исследовании ППК, ЭСК и клеток зародышевой семиномы было установлено, что все три типа клеток обладают некими сходными характеристиками, одной из которых является экспрессия поверхностного клеточного маркера CD38 [26]. Кроме того, было установлено, что транскрипционный фактор SOX17 играет важную роль в детерминации чППК и является ранним маркером ППК [26].

В идентификации и образовании первичных гоноцитов *in vitro* используют трансфекцию чПСК репортерными флуоресцентными генами под промоторами маркерных генов ППК (основными из них являются *NANOS3* и *VASA*) с последующей сортировкой. *NANOS3* – ранний маркер первичных гоноцитов, играющий важную роль в формировании и детерминации эпигенетической программы [67–69]. Отсутствие экспрессии гена *VASA* в остальных типах клеток делает его уникальным маркером, что позволяет изучать с его помощью миграцию и позднюю судьбу чППК в развитии. Трансфекция репортерными генами ПСК *in vitro* предоставляет возможность идентифицировать ППК [62, 63, 66] и работать с чистой культурой клеток [26].

Следующий подход в получении ППК состоит в культивировании ПСК в определенных условиях и индукции дифференцировки при помощи определенных факторов роста. Работы, проведенные в этом направлении, показали, что развитие ППК *in vitro* у человека значительно отличается от аналогичного процесса у мыши

[26, 70]. Так, например, при помощи различных методов было выявлено, что чППК экспрессируют факторы OCT3/4 и NANOG, традиционно связываемые с плюрипотентностью, однако, в отличие от ППК мыши, SOX2, такой же фундаментальный фактор плюрипотентности, не экспрессируется в чППК [71]. Экспрессия PRDM1 подавляет в чППК экспрессию SOX2, который необходим и для нейральной дифференцировки [65]. Стандартным методом индукции ППК из ПСК человека является воздействие на ПСК рекомбинантным BMP4, который увеличивает экспрессию специфических маркеров ППК во время дифференцировки ПСК в ЭТ [49, 72].

Следующим шагом является стандартизация среды. Easley et al. показали, что после культивирования ЭСК и ИПСК в стандартизированной культуральной среде для сперматогонимальных стволовых клеток мыши часть ЭСК и ИПСК дифференцировалась в сперматоцитоподобные клетки [73]. В культурах наблюдалось появление LITF1-, PLZF- и CDH1-позитивных сперматогоний-подобных клеток, *HIWI*- и *HILI*-экспрессирующих сперматоцитоподобных клеток и гаплоидных клеток, демонстрирующих положительное окрашивание на акрозин, транзиторийный белок 1 и протамин 1 [73]. Однако низкая частота и эффективность подобных дифференцировок в ППК *in vitro* (не более 5%) подталкивают исследователей к дальнейшему улучшению методик культивирования, которое осуществляется путем добавления различных цитокинов и ингибиторов (например, LIF, GSK3- β i, ERK1/2i, p38i, JNKi, ROCKi) в культуральные среды [74–76]. Подобные методы позволяют увеличить частоту получения ППК *in vitro* в 9 раз относительно традиционной индукции, стандартного культивирования ЭТ в присутствии BMP4 [26]. Исследователи считают, что добавление LIF, GSK3- β i, ERK1/2i, p38i и JNKi в среду приближает культуры ПСК к основному состоянию наивной плюрипотентности, что в итоге повышает эффективность получения ППК. Наивное состояние ПСК сходно с состоянием плюрипотентности внутренней клеточной массы доимплантационной бластоцисты [74, 77]. Роль ROCKi, возможно, связана с ингибированием апоптоза и повышением эффективности клонирования при образовании ЭТ [78]. Комбинирование вышеперечисленных подходов с культивированием в определенных условиях и индукцией специфическими факторами роста приближает исследователей к моделированию специализации и дифференцировки ППК *in vitro* и систематизации ключевых регуляторных компонентов первичных гоноцитов.

Регуляторные механизмы спецификации и дифференцировки ППК *in vitro* и *in vivo* также

еще до конца не изучены (рис. 2). В настоящее время общепризнано, что BMP4 является основным индуктором дифференцировки ППК у человека [49]. Воздействие BMP4 на ЭСК человека приводит к повышению концентрации фосфорилированного SMAD1/5/8 [79]. Иммунофлуоресцентным методом было показано, что эти же клетки экспрессировали OCT4, VASA, DAZL и STELLA в солокализации с поверхностным белком ЕрСАН, который предположительно является маркером чППК. Известно, что при активации BMP-каскада в клетках ЭТ начинается экспрессия раннего мезодермального маркера брахиури (Т-ген) [26, 80], что совпадает с данными, полученными на ЭТ мыши [81]. Брахиури – маркер мезодермы, который вызывает экспрессию мезодермальных генов, активируемую WNT3-путем. В работе Агамакі [82] было показано, что при воздействии BMP4 на клетки проксимального эпибласта брахиури перемещается с промоторов мезодермальных генов на ре-

гуляторные элементы *Prdm1* и *Prdm14*, и запускается программа развития половой линии. Таким образом, экспрессия брахиури уже присутствует в мезодермальных клетках и опосредует индукцию половой дифференцировки [82]. Также в первые дни дифференцировки чППК была выявлена экспрессия энтодермального транскрипционного фактора SOX17 и гена *PRDM14*, кодирующего один из факторов поддержания плюрипотентности и наивности ЭСК человека [26, 80, 83]. При дальнейшей дифференцировке чППК экспрессия *PRDM14* значительно снижается, в отличие от дифференцировки ППК мыши [21], что может в очередной раз указывать на уникальность механизмов дифференцировки чППК и участия в них гена *PRDM14* [84, 85]. Было показано, что в поздних чППК *SOX2* и *PRDM14* экспрессируются на низких уровнях. Присутствие *PRDM14* для них критично: низкий уровень экспрессии гена *PRDM14* является достаточным для дифференцировки чППК, а отсут-

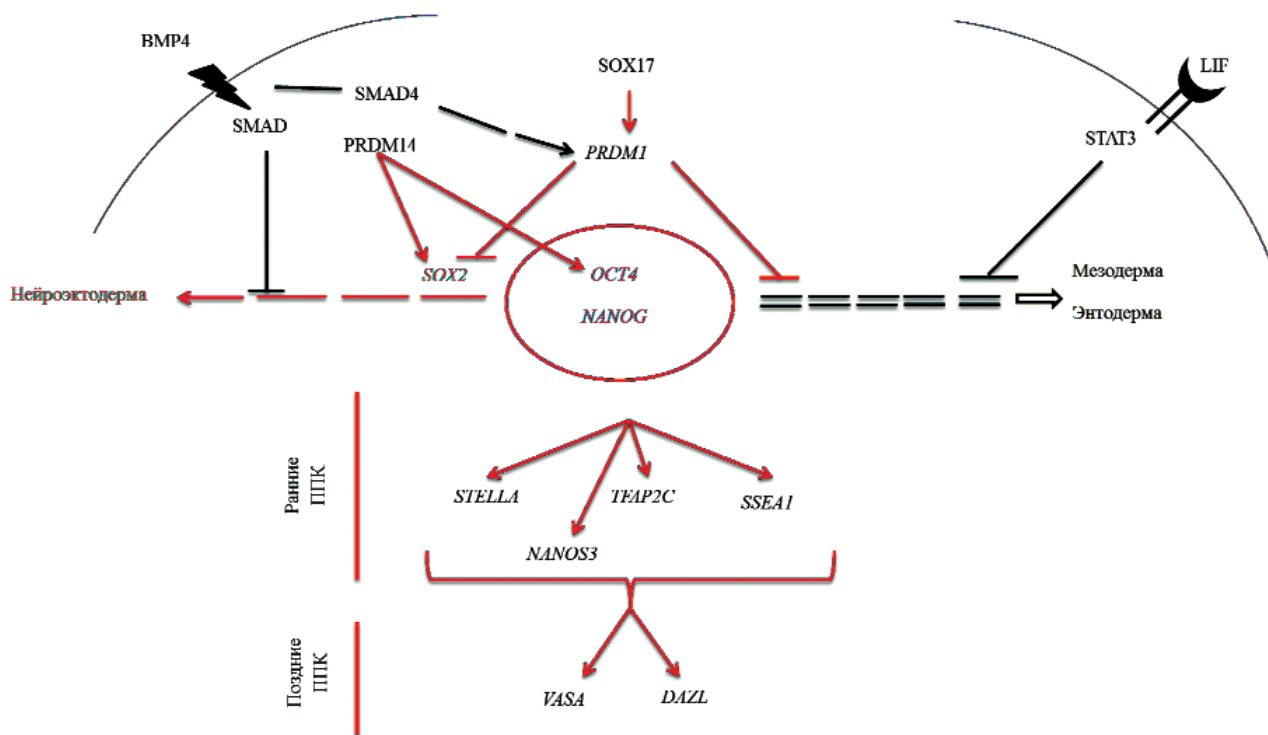


Рис. 2. Механизмы взаимодействия различных транскрипционных факторов и сигнальных каскадов генов при дифференцировке ПСК в ППК человека. BMP4 связывается с рецептором, в результате происходит фосфорилирование белков SMAD и их олигомеризация со SMAD4 канонического пути. Активированный SMAD4 переносится в ядро и индуцирует экспрессию *PRDM1*, который непосредственно блокирует экспрессию *SOX2*, не давая клетке дифференцироваться в нейроэктодерму. Присутствие в клетке *PRDM14* на низком уровне поддерживает активность генов *OCT4*, *NANOG* и *SOX2*. BMP4-сигнальный путь воздействует на экспрессию *PRDM1*. *PRDM1* также блокирует дифференцировку клетки по мезодермальному и энтодермальному путям. *SOX17* с помощью *PRDM1* индуцирует гены ППК: *NANOS3*, *STELLA*, *TFAP2C*, *SSEA1*, *VASA* и *DAZL*. Сигнальный путь LIF/STAT3 блокирует дифференцировку ЭСК в мезодермальном и энтодермальном направлениях у мыши [95]. У человека при активации сигнального пути LIF/STAT3 не поддерживается возобновление ЭСК [96]. Возможно, в данном случае сигнальный путь LIF/STAT3 играет дополнительную роль в формировании ППК человека путем блокирования дифференцировки в соматические клетки.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

ствие этого гена отражается на фенотипе чППК [80] (табл. 1). В результате экспрессии SOX17 и PRDM14, по всей видимости, образуется гетерогенная мезодермальная клеточная популяция [80, 83]. SOX17 в данном случае может играть ключевую роль регулятора в спецификации чППК [44, 62], т.к. он обнаруживается в беспорядочно расположенных клетках ЭТ на самых ранних этапах дифференцировки. Далее SOX17 экспрессируется вместе с PRDM1 (маркером ранних ППК) уже в кластере скопившихся клеток ЭТ, готовых к миграции [26, 83]. Подобные наблюдения говорят о том, что SOX17 является более ранним маркером ППК, чем тот же PRDM1, который находится ниже в иерархии каскада гена SOX17 и определяет дифференцировку ППК из мезодермальноподобных клеток. Было показано, что экспрессия PRDM1 напрямую зависит от наличия BMP в среде и вызывает экспрессию маркерных генов половых

клеток – VASA и SCP3 [65]. Роль PRDM1, возможно, также может заключаться в постоянном подавлении энтодермального и мезодермального путей развития клеток [26] (рис. 2). Ранний маркер – ядерный белок NANOS3 – был выявлен в гоноцитах XX и XY [67]. При подавлении морфалином экспрессии NANOS3 в гоноцитах снижается число гоноцитов и подавляется экспрессия генов, ответственных за поддержание плюрипотентности, а также генов, регулирующих инициацию и прохождение мейоза [67]. В дефицитных по NANOS3 клеточных линиях повышается экспрессия SOX17 и PRDM1 [64]. Сверхэкспрессия гена NANOS3 приводит к удлинению стадии плюрипотентности и задержке дифференцировки [30]. В результате активности генов ранних маркеров ППК (SOX17, PRDM14 и PRDM1) начинает экспрессироваться ряд генов, отвечающих за пролиферацию, миграцию и дальнейшее созревание половых клеток (табл. 3).

Таблица 3. Маркеры, специфичные для ПСК, ранних и поздних ППК и половых клеток

Маркер	ЭСК/ИПСК человека	Ранние ППК	Поздние ППК	Половые клетки
OCT4	+ [48, 53, 72, 74, 75]	+ [50, 53, 70]		
SOX2	+ [54, 62, 70, 74, 78]	– [26, 52, 62, 65, 71, 83]	– [52]	
NANOG	+ [48, 54, 70, 74, 75]	+ [18, 19]		
PRDM14	+ [21, 85]	+ [26, 80]	± [80]	
SSEA3	+ [74, 75, 76, 77]			
SSEA4	+ [48, 74]	+ [52]		
TRA1-60	+ [48, 74]			
TRA1-81	+ [47, 48, 54, 74]	+ [80]		
SSEA1	– [53, 54, 74]	+ [52, 70, 48]	+ [53, 70]	
cKIT (CD117)		+ [50, 52, 68, 80, 87]	+ [47, 52, 53]	
SOX17	– [50]	+ [64, 80, 87]		
PRDM1 (BLIMP1)	– [50, 62]	+ [50, 62, 65, 87]	+ [53, 87] – [62]	
NANOS3		+ [28, 30, 62, 68, 80]	+ [80]	
CD38	– [26]	+ [26]	+ [26]	
VASA (DDX4)	– [53, 54]		+ [14, 47, 53, 58, 63]	
DAZL	– [47]	+ [47]	+ [30, 47, 53, 63]	
Tfp2c		+ [26, 80]		
STELLAR	+ [47]	+ [47]	+ [47]	
PLAP	– [52]	+ [79]	+ [52]	
DPPA3 (STELLA)		+ [14, 62, 87]	+ [14, 53, 87]	
SCP1			– [50]	+ [43, 47, 54]
SCP3				+ [43, 47, 54]
Акрозин				+ [53, 73]

Примечание. Знаком «плюс» показано наличие, знаком «плюс–минус» – возможное наличие, а знаком «минус» – отсутствие экспрессии соответствующих маркеров.

После заселения гонады под воздействием ретиноевой кислоты в оогониях инициируется мейоз, а в гонаде мужского типа эмбриональные клетки Сертоли синтезируют цитохром Сур26b1 и разрушают ретиноевую кислоту, в результате чего блокируется инициация мейоза [88, 89] (рис. 3).

Бесплодие является, как правило, неизлечимой патологией, которая вызвана различными нарушениями половых клеток, их нефункциональностью или даже полным их отсутствием. Подсчитано, что в результате снижения качественных и количественных характеристик мужских и женских половых клеток из-за генетичес-

ких и экологических причин [90–93] бесплодием страдают 15–25% пар репродуктивного возраста [87, 94]. Можно надеяться, что исследования процессов развития ППК *in vitro* позволят понять механизмы специализации и дифференцировки ППК, что приведет к созданию компетентных моделей бесплодия, врожденных аномалий и т.д. С другой стороны, получение гоноцитов человека *in vitro* – это новое направление вспомогательных репродуктивных технологий. Данные технологии могут быть востребованы также в случаях, когда пациенты теряют репродуктивные способности вследствие химио- или лучевой терапии злокачественных заболеваний.

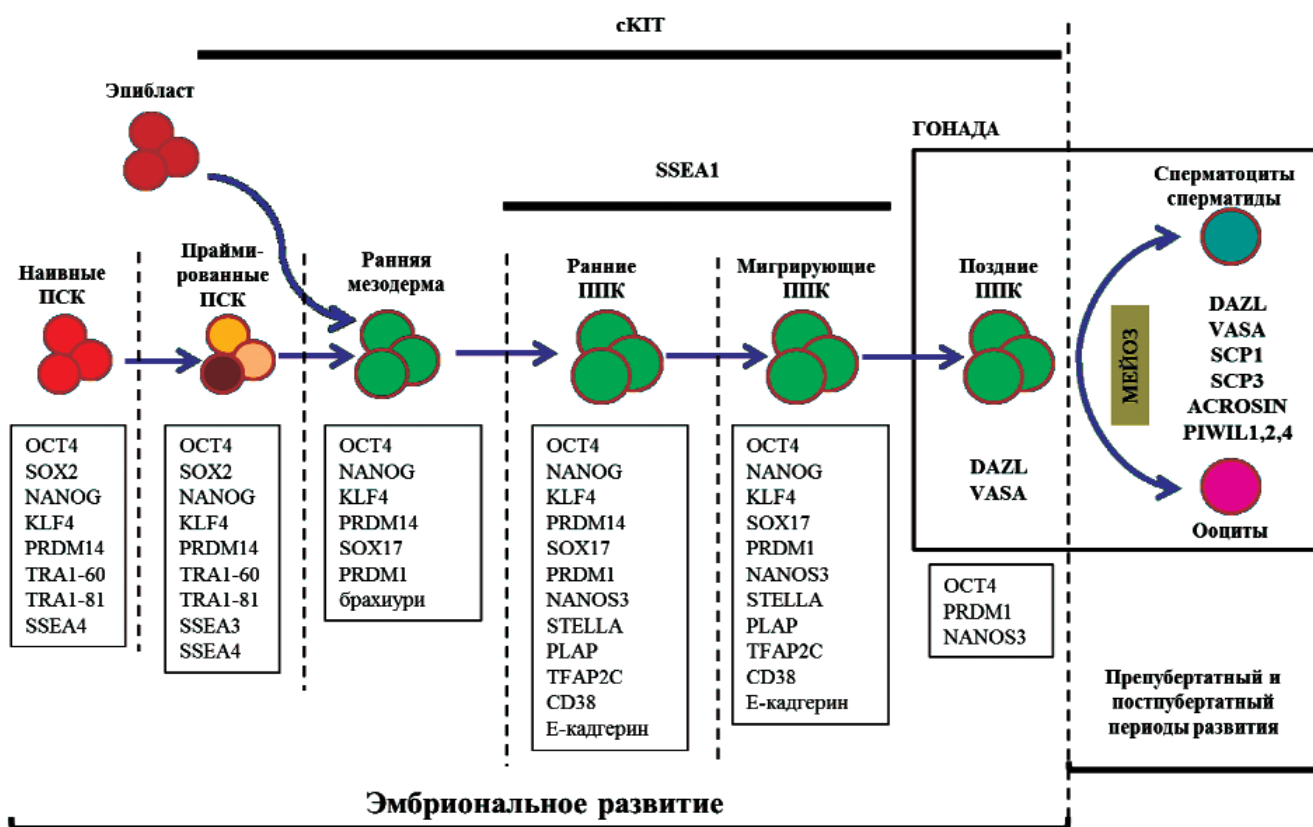


Рис. 3. Схема развития ППК человека. В формировании половых клеток выделяют два основных периода развития: эмбриональный и препубертатный/постпубертатный. Эмбриональное развитие включает раннее обособление ППК из эпибласта под аллантоисом *in vivo*, дифференцировку ПСК в раннюю мезодерму, а затем в ранние ППК *in vitro*, стадию миграции ППК и заселение ППК в гонаду. Пунктирной линией обозначены переходы между этапами. На каждом переходе активируется и поддерживается экспрессия определенных наборов генов. Эпибласт и праймированные (primed) ПСК начинают нарабатывать поверхностный белок сKIT, который сохраняется до заселения гонады. Ранние и мигрирующие ППК начинают синтезировать поверхностный маркер SSEA1. Заселившие гонаду поздние ППК активируют мейоз у женского типа гонады, а в мужском типе продолжается митотическое деление ППК. У женских ППК мейоз проходит до мейоза II деления и останавливается на стадии метафазы II деления мейоза до оплодотворения. Митотическое и мейотическое деления женских половых клеток останавливаются в эмбриональном периоде. В препубертатном развитии мужских половых клеток продолжается митотическое деление и структурное формирование семенника. В пубертатный период мужские половые клетки начинают мейотическое деление и дифференцировку в сперматозоиды. Женские половые клетки созревают до ооцитов II деления мейоза, и в половозрелом возрасте начинается овуляция. Наивные ПСК – клетки, находящиеся в состоянии плюрипотентности, схожие с внутренней клеточной массой бластоцисты. Праймированные ПСК – клетки в состоянии плюрипотентности, схожие с эпибластом предгастрюляционного периода и уже коммитированные к дифференцировке в три зародышевых листка.

С цветным вариантом рис. 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

К перспективам использования ППК и их производных, полученных *in vitro*, следует отнести приложения в фармацевтике для создания тест-систем, изучающих влияние лекарственных средств на половые клетки человека, а также возможность исследования молекулярного патогенеза таких болезней, как опухоли половых клеток, анеуплоидии и аномалии половых хромосом.

Подводя итог, можно сказать, что культивирование ПСК человека и получение из них ППК *in vitro* является быстро развивающейся сферой

биомедицины, которая может привести к прорыву в понимании биологии плюрипотентности.

Финансирование

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института биологии развития им. Н.К. Колцова РАН.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K., and Saitou, M. (2008) Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice, *Genes Dev.*, **22**, 1617–1635, doi: 10.1101/gad.1649908.
- Tanaka, S.S., Yamaguchi, Y.L., Tsoi, B., Lickert, H., and Tam, P.P. (2005) IFITM/mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion, *Dev. Cell.*, **9**, 745–756, doi: 10.1016/j.devcel.2005.10.010.
- Ginsburg, M., Snow, M.H., and McLaren, A. (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation, *Development*, **110**, 521–528.
- Irie, N., Tang, W.W., and Azim Surani, M. (2014) Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis, *Reprod. Med. Biol.*, **13**, 203–215, doi: 10.1007/s12522-014-0184-2.
- Saitou, M., and Yamaji, M. (2010) Germ cell specification in mice: signaling, transcription regulation, and epigenetic consequences, *Reproduction*, **139**, 931–942, doi: 10.1530/REP-10-0043.
- De Felici, M. (2013) Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells, in *Oogenesis* (Coticchio, G., Albertini, D.F., and De Santis, L., eds.), Springer, London, pp. 19–38, doi: 10.1007/978-0-85729-826-2.
- Leitch, H.G., Tang, W.W., and Surani, M.A. (2013) Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **104**, 149–187, doi: 10.1016/B978-0-12-416027-9.00005-X.
- Кожухарь В.Г. (2011) Первичные половые клетки млекопитающих и человека. Происхождение, идентификация, миграция, *Цитология*, **53**, 211–220.
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., and Hogan, B.L. (1999) Mouse embryo Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo, *Genes Dev.*, **13**, 424–436.
- Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., and Saitou, M. (2009) A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice, *Cell*, **137**, 571–584, doi: 10.1016/j.cell.2009.03.014.
- Okamura, D., Hayashi, K., and Matsui, Y. (2005) Mouse epiblasts change responsiveness to BMP4 signal required for PGC formation through functions of extraembryonic ectoderm, *Mol. Reprod. Dev.*, **70**, 20–29, doi: 10.1002/mrd.20136.
- Ying, Y., and Zhao, G.Q. (2001) Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse, *Dev. Biol.*, **232**, 484–492, doi: 10.1006/dbio.2001.0173.
- Lange, U.C., Saitou, M., Western, P.S., Barton, S.C., and Surani, M.A. (2003) The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice, *BMC Dev. Biol.*, **3**, 1, doi: 10.1186/1471-213X-3-1.
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., and Surani, M.A. (2005) Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice, *Nature*, **436**, 207–213, doi: 10.1038/nature03813.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Scholer, H.R., and Tomilin, A. (2004) Oct4 is required for primordial germ cell survival, *EMBO Rep.*, **5**, 1078–1083, doi: 10.1038/sj.embor.7400279.
- Okamura, D., Tokitake, Y., Niwa, H., and Matsui, Y. (2008) Requirement of Oct3/4 function for germ cell specification, *Dev. Biol.*, **317**, 576–584, doi: 10.1016/j.ydbio.2008.03.002.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007) Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development, *Nature*, **450**, 1230–1234, doi: 10.1038/nature06403.
- Yamaguchi, S., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Sasaki, H., Nakatsuji, N., Saitou, M., and Tada, T. (2009) Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells, *Development*, **136**, 4011–4020, doi: 10.1242/dev.041160.
- Murakami, K., Gunesdogan, U., Zyllicz, J.J., Tang, W.W.C., Sengupta, R., Kobayashi, T., Kim, S., Butler, R., Dietmann, S., and Surani, A.M. (2016) NANOG alone induces germ cells in primed epiblast *in vitro* by activation of enhancers, *Nature*, **529**, 1–22, doi: 10.1038/nature16480.
- Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2008) Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice, *Nat. Genet.*, **40**, 1016–1022, doi: 10.1038/ng.186.
- Grabole, N., Tischler, J., Hackett, J.A., Kim, S., Tang, F., Leitch, H.G., Magnusdotir, E., and Surani, M.A. (2013) Prdm14 promotes germline fate and naive pluripotency by repressing FGF signalling and DNA methylation, *EMBO Reports*, **14**, 629–637, doi: 10.1038/embor.2013.67.
- Gell, J.J., Zhao, J., Chen, D., Hunt, T.J., and Clark, A.T. (2018) PRDM14 is expressed in germ cell tumors with constitutive overexpression altering human germline differentiation and proliferation, *Stem Cell Res.*, **27**, 46–56, doi: 10.1016/j.scr.2017.12.016.

23. Weber, S., Eckert, D., Nettersheim, D., Gillis, A.J., Schafer, S., Kuckenberger, P., Ehlermann, J., Werling, U., Biermann, K., Looijenga, L.H., and Schorle, H. (2010) Critical function of AP-2 gamma/TCFAP2C in mouse embryonic germ cell maintenance, *Biol. Reprod.*, **82**, 214–223, doi: 10.1095/biolreprod.109.078717.
24. Kumar, D.L., and Defalco, T. (2017) Of mice and men: *in vivo* and *in vitro* studies of primordial germ cell specification, *Semin. Reprod. Med.*, **35**, 139–146, doi: 10.1055/s-0037-1599085.
25. Vincent, S.D. (2005) The zinc finger transcriptional repressor *Blimp1/Prdm1* is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse, *Development*, **132**, 1315–1325, doi: 10.1242/dev.01711.
26. Irie, N., Weinberger, L., Tang, W.W., Kobayashi, T., Viukov, S., Manor, Y.S., Dietmann, S., Hanna, J.H., and Surani, M.A. (2015) *SOX17* is a critical specifier of human primordial germ cell fate, *Cell*, **160**, 253–268, doi: 10.1016/j.cell.2014.12.013.
27. Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., and Saga, Y. (2003) Conserved role of nanos proteins in germ cell development, *Science*, **301**, 1239–1241, doi: 10.1126/science.1085222.
28. Suzuki, H., Tsuda, M., Kiso, M., and Saga, Y. (2008) *Nanos3* maintains the germ cell lineage in the mouse by suppressing both *Bax*-dependent and -independent apoptotic pathways, *Dev. Biol.*, **318**, 133–142, doi: 10.1016/j.ydbio.2008.03.020.
29. Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., and Noce, T. (2000) The mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells, *Genes Dev.*, **14**, 841–853, doi: 10.1101/gad.14.7.841.
30. Panula, S., Reda, A., Stukenborg, J.-B. B., Ramathal, C., Sukhwani, M., Albalushi, H., Edsgard, D., Nakamura, M., Soder, O., Orwig, K.E., Yamanaka, S., Reijo Pera, R.A., and Hovatta, O. (2016) Over expression of *NANOS3* and *DAZL* in human embryonic stem cells, *PLoS One*, **11**, e0165268, doi: 10.1371/journal.pone.0165268.
31. Schrans-Stassen, B.H., Saunders, P.T., Cooke, H.J., and de Rooij, D.G. (2001) Nature of the spermatogenic arrest in *Dazl*^{-/-} mice, *Biol. Reprod.*, **65**, 771–776, doi: 10.1095/biolreprod65.3.771.
32. Buehr, M., McLaren, A., Bartley, A., and Darling, S. (1993) Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos, *Dev. Dyn.*, **198**, 182–189, doi: 10.1002/aja.1001980304.
33. Kudo, T., Kaneko, M., Iwasaki, H., Togayachi, A., Nishihara, S., Abe, K., and Narimatsu, H. (2004) Normal embryonic and germ cell development in mice lacking α disappearance of stage-specific embryonic antigen 1 normal embryonic and germ cell development in mice lacking 1,3-fucosyltransferase IX (*Fut9*) which show disappearance of stage-specific E, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 4221–4228, doi: 10.1128/MCB.24.10.4221.
34. Payer, B., Saitou, M., Barton, S.C., Thresher, R., Dixon, J.P.C., Zahn, D., Colledge, W.H., Carlton, M.B., Nakano, T., and Surani, M.A. (2003) *Stella* is a maternal effect gene required for normal early development in mice, *Curr. Biol.*, **13**, 2110–2117, doi: 10.1016/j.cub.2003.11.026.
35. Saitou, M., Kagiwada, S., and Kurimoto, K. (2012) Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells, *Development*, **139**, 15–31, doi: 10.1242/dev.050849.
36. De Felici, M. (2009) Primordial germ cell biology at the beginning of the XXI century, *Int. J. Dev. Biol.*, **53**, 891–894, doi: 10.1387/ijdb.082815mf.
37. Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., and Bradley, A. (1999) Requirement for *Wnt3* in vertebrate axis formation, *Nat. Genet.*, **22**, 361–365, doi: 10.1038/11932.
38. Yoon, Y., Huang, T., Tortelote, G.G., Wakamiya, M., Hadjantonakis, A.K., Behringer, R.R., and Rivera-Perez, J.A. (2015) Extra-embryonic *Wnt3* regulates the establishment of the primitive streak in mice, *Dev. Biol.*, **403**, 80–88, doi: 10.1016/j.ydbio.2015.04.008.
39. McKay, D.G., Hertig, A.T., Adams, E.C., and Danziger, S. (1953) Histochemical observations on the germ cells of human embryos, *Anat. Rec.*, **117**, 201–219, doi: 10.1002/ar.1091170206.
40. Kellokumpu-Lehtinen, P.L., and Soderstrom, K.O. (1978) Occurrence of nuage in fetal human germ cells, *Cell Tissue Res.*, **194**, 171–177, doi: 10.1007/BF00209243.
41. Findley, S.D., Tamanaha, M., Clegg, N.J., and Ruohola-Baker, H. (2003) *Maelstrom*, a *Drosophila* spindle-class gene, encodes a protein that colocalizes with *Vasa* and *RDE1/AGO1* homolog, *Aubergine*, in nuage, *Development*, **130**, 859–871, doi: 10.1242/dev.00310.
42. Ishidate, T., Ozturk, A.R., Durning, D.J., Sharma, R., Shen, E.Z., Chen, H., Seth, M., Shirayama, M., and Mello, C.C. (2018) *ZNF-X-1* functions within perinuclear nuage to balance epigenetic signals, *Mol. Cell*, **70**, P639–649.E6, doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.009.
43. Soper, S.F.C., van der Heijden, G.W., Hardiman, T.C., Goodheart, M., Martin, S.L., de Boer, P., and Bortvin, A. (2008) Mouse *maelstrom*, a component of nuage, is essential for spermatogenesis and transposon repression in meiosis, *Dev. Cell.*, **15**, 285–297, doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.015.
44. Morohaku, K., Tanimoto, R., Sasaki, K., Kawahara-Miki, R., Kono, T., Hayashi, K., Hirao, Y., and Obata, Y. (2016) Complete *in vitro* generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113**, 201603813–201603817, doi: 10.1073/pnas.1603817113.
45. Zhou, Q., Wang, M., Yuan, Y., Wang, X., Fu, R., Wan, H., Hirao, Y., and Zhou, Q. (2016) Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells *in vitro*, *Cell Stem Cell*, **18**, 330–340, doi: 10.1016/j.stem.2016.01.017.
46. Turnpenny, L., Brickwood, S., Spalluto, C.M., Piper, K., Cameron, I.T., Wilson, D.I., and Hanley, N.A. (2003) Derivation of human embryonic germ cells: an alternative source of pluripotent stem cells, *Stem Cells*, **21**, 598–609, doi: 10.1634/stemcells.21-5-598.
47. Clark, A.T., Bodnar, M.S., Fox, M., Rodriguez, R.T., Abeyta, M.J., Firpo, M.T., and Pera, R.A. (2004) Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells *in vitro*, *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 727–739, doi: 10.1093/hmg/ddh088.
48. Tilgner, K., Atkinson, S.P., Golebiewska, A., Stojkovic, M., Lako, M., and Armstrong, L. (2008) Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **26**, 3075–3085, doi: 10.1634/stemcells.2008-0289.
49. Kee, K., Gonsalves, J.M., Clark, A.T., and Pera, R.A. (2006) Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells, *Stem Cells Dev.*, **15**, 831–837, doi: 10.1089/scd.2006.15.831.
50. Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J.F., 3rd, Boiani, M., and Scholer, H.R. (2003) Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells, *Science*, **300**, 1251–1256, doi: 10.1126/science.1083452.
51. Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K., Daley, G.Q., Change, G., and Jaarsveld, V. (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells, *Nature*, **427**, 148–154, doi: 10.1038/nature02121.1.
52. Park, T.S., Galic, Z., Conway, A.E., Lindgren, A., van Handel, B.J., Magnusson, M., Richter, L., Teitell, M.A.,

- Mikkola, H.K., Lowry, W.E., Plath, K., and Clark, A.T. (2009) Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells, *Stem Cells*, **27**, 783–795, doi: 10.1002/stem.13.
53. Panula, S., Medrano, J.V., Kee, K., Bergstrom, R., Nguyen, H.N., Byers, B., Wilson, K.D., Wu, J.C., Simon, C., Hovatta, O., and Reijo Pera, R.A. (2011) Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 752–762, doi: 10.1093/hmg/ddq520.
54. Eguizabal, C., Montserrat, N., Vassena, R., Barragan, M., Garreta, E., Garcia-Quevedo, L., Vidal, F., Giorgetti, A., Veiga, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011) Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells, *Stem Cells*, **29**, 1186–1195, doi: 10.1002/stem.672.
55. Xie, L., Lin, L., Tang, Q., Li, W., Huang, T., Huo, X., Liu, X., Jiang, J., He, G., and Ma, L. (2015) Sertoli cell-mediated differentiation of male germ cell-like cells from human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in an *in vitro* co-culture system, *Eur. J. Med. Res.*, **20**, 9, doi: 10.1186/s40001-014-0080-6.
56. Fujimoto, T., Miyayama, Y., and Fuyuta, M. (1977) The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells, *Anat. Rec.*, **188**, 315–329, doi: 10.1002/ar.1091880305.
57. Funkuda, T. (1976) Ultrastructure of primordial germ cells in human embryo, *Virchows Archiv. B: Cell Pathology*, **20**, 85–89.
58. Castrillon, D.H., Quade, B.J., Wang, T.Y., Quigley, C., and Crum, C.P. (2000) The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9585–9590, doi: 10.1073/pnas.160274797.
59. Eguizabal, C., Herrera, L., De Onate, L., Montserrat, N., Hajkova, P., and Izpisua Belmonte, J.C. (2016) Characterization of the epigenetic changes during human gonadal primordial germ cells reprogramming, *Stem Cells*, **34**, 2418–2428, doi: 10.1002/stem.2422.
60. Kerr, C.L., Hill, C.M., Blumenthal, P.D., and Gearhart, J.D. (2008) Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal ovary, *Hum. Reprod.*, **23**, 589–599, doi: 10.1093/humrep/dem411.
61. Kerr, C.L., Hill, C.M., Blumenthal, P.D., and Gearhart, J.D. (2008) Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis, *Stem Cells*, **26**, 412–421, doi: 10.1634/stemcells.2007-0605.
62. Leng, L., Tan, Y., Gong, F., Hu, L., Ouyang, Q., Zhao, Y., Lu, G., and Lin, G. (2015) Differentiation of primordial germ cells from induced pluripotent stem cells of primary ovarian insufficiency, *Hum. Reprod.*, **30**, 737–748, doi: 10.1093/humrep/deu358.
63. Medrano, J.V., Ramathal, C., Nguyen, H.N., Simon, C., and Reijo Pera, R.A. (2012) Divergent RNA-binding proteins, DAZL and VASA, induce meiotic progression in human germ cells derived *in vitro*, *Stem Cells*, **30**, 441–451, doi: 10.1002/stem.1012.
64. Zhao, Y., Ye, S., Liang, D., Wang, P., Fu, J., Ma, Q., Kong, R., Shi, L., Gong, X., Chen, W., Ding, W., Yang, W., Zhu, Z., Chen, H., Sun, X., Zhu, J., Li, Z., and Wang, Y. (2018) *In vitro* modeling of human germ cell development using pluripotent stem cells, *Stem Cell Reports*, **10**, 509–523, doi: 10.1016/j.stemcr.2018.01.001.
65. Lin, I.Y., Chiu, F.L., Yeang, C.H., Chen, H.F., Chuang, C.Y., Yang, S.Y., Hou, P.S., Sintupisut, N., Ho, H.N., Kuo, H.C., and Lin, K.I. (2014) Suppression of the SOX2 neural effector gene by PRDM1 promotes human germ cell fate in embryonic stem cells, *Stem Cell Reports*, **2**, 189–204, doi: 10.1016/j.stemcr.2013.12.009.
66. Hayashi, Y., Saitou, M., and Yamanaka, S. (2012) Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility, *Fertil. Steril.*, **97**, 1250–1259, doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.037.
67. Angeles Julaton, V.T., and Reijo Pera, R.A. (2011) NANOS3 function in human germ cell development, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 2238–2250, doi: 10.1093/hmg/ddr114.
68. Gkoutela, S., Li, Z., Vincent, J.J., Zhang, K.X., Chen, A., Pellegrini, M., and Clark, A.T. (2013) The ontogeny of cKIT⁺ human primordial germ cells proves to be a resource for human germ line reprogramming, imprint erasure and *in vitro* differentiation, *Nat. Cell Biol.*, **15**, 113–122, doi: 10.1038/ncb2638.
69. Hackett, J.A., Zyllicz, J.J., and Surani, M.A. (2012) Parallel mechanisms of epigenetic reprogramming in the germline, *Trends Genet.*, **28**, 164–174, doi: 10.1016/j.tig.2012.01.005.
70. Hara, K., Kanai-Azuma, M., Uemura, M., Shitara, H., Taya, C., Yonekawa, H., Kawakami, H., Tsunekawa, N., Kurohmaru, M., and Kanai, Y. (2009) Evidence for crucial role of hindgut expansion in directing proper migration of primordial germ cells in mouse early embryogenesis, *Dev. Biol.*, **330**, 427–439, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.04.012.
71. Perrett, R.M., Turnpenny, L., Eckert, J.J., O'Shea, M., Sonne, S.B., Cameron, I.T., Wilson, D.I., Rajpert-De Meyts, E., and Hanley, N.A. (2008) The early human germ cell lineage does not express SOX2 during *in vivo* development or upon *in vitro* culture, *Biol. Reprod.*, **78**, 852–858, doi: 10.1095/biolreprod.107.066175.
72. West, J.A., Viswanathan, S.R., Yabuuchi, A., Cunniff, K., Takeuchi, A., Park, I.H., Sero, J.E., Zhu, H., Perez-Atayde, A., Frazier, A.L., Surani, M.A., and Daley, G.Q. (2009) A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy, *Nature*, **460**, 909–913, doi: 10.1038/nature08210.
73. Easley, C.A., Phillips, B.T., McGuire, M.M., Barringer, J.M., Valli, H., Hermann, B.P., Simerly, C.R., Rajkovic, A., Miki, T., Orwig, K.E., and Schatten, G.P. (2012) Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells, *Cell Reports*, **2**, 440–446, doi: 10.1016/j.celrep.2012.07.015.
74. Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A.A., Manor, Y.S., Chomsky, E., Ben-Yosef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., Rais, Y., Shipony, Z., Mukamel, Z., Krupalnik, V., Zerbib, M., Geula, S., Caspi, I., Schneir, D., Shwartz, T., Gilad, S., Amann-Zalcenstein, D., Benjamin, S., Amit, I., Tanay, A., Massarwa, R., Novershtern, N., and Hanna, J.H. (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells, *Nature*, **504**, 282–286, doi: 10.1038/nature12745.
75. Kilens, S., Meistermann, Di., Moreno, Di., Chariou, C., Gaignerie, A., Reignier, A., Lelievre, Y., Casanova, M., Vallot, C., Nedellec, S., Flippe, L., Firmin, J., Song, J., Charpentier, E., Lammers, J., Donnart, A., Marec, N., Deb, W., Bihouee, A., Le Caignec, C., Pecqueur, C., Redon, R., Barriere, P., Bourdon, J., Pasque, V., Soumillon, M., Mikkelsen, T.S., Rougeulle, C., Freour, T., David, L.; Milieu Interieur Consortium (2018) Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells, *Nat. Commun.*, **9**, 1–13, doi: 10.1038/s41467-017-02107-w.
76. Theunissen, T.W., Friedli, M., He, Y., Planet, E., O'Neil, R.C., Markoulaki, S., Pontis, J., Wang, H., Iouranova, A., Imbeault, M., Duc, J., Cohen, M.A., Wert, K.J., Castanon, R., Zhang, Z., Huang, Y., Nery, J.R., Drotar, J., Lungjangwa, T., Trono, D., Ecker, J.R., and Jaenisch, R. (2016) Molecular criteria for defining the naive human pluripotent state, *Cell Stem Cell*, **19**, 502–515, doi: 10.1016/j.stem.2016.06.011.
77. Ware, C.B., Nelson, A.M., Mecham, B., Hesson, J., Zhou, W., Jonlin, E.C., Jimenez-Caliani, A.J., Deng, X., Cavanaugh, C., Cook, S., Tesar, P.J., Okada, J., Margaretha, L., Sperber, H., Choi, M., Blau, C.A., Treuting, P.M., Hawkins, R.D.,

- Cirulli, V., and Ruohola-Baker, H. (2014) Derivation of naive human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 4484–4489, doi: 10.1073/pnas.1319738111.
78. Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S.I., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.*, **25**, 681–686, doi: 10.1038/nbt1310.
79. Chuang, C.Y., Lin, K.I., Hsiao, M., Stone, L., Chen, H.F., Huang, Y.H., Lin, S.P., Ho, N.N., and Kuo, H.C. (2012) Meiotic competent human germ cell-like cells derived from human embryonic stem cells induced by BMP4/WNT3A signaling and OCT4/EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) selection, *J. Biol. Chem.*, **287**, 14389–14401, doi: 10.1074/jbc.M111.338434.
80. Sugawa, F., Arauzo-Bravo, M. J., Yoon, J., Kim, K.-P., Aramaki, S., Wu, G., Stehling, M., Psathaki, O.E., Hubner, K., and Scholer, H.R. (2015) Human primordial germ cell commitment *in vitro* associates with a unique PRDM14 expression profile, *EMBO J.*, **34**, 1009–1024, doi: 10.15252/emboj.201488049.
81. Bernardo, A.S., Faial, T., Gardner, L., Niakan, K.K., Ortmann, D., Senner, C.E., Callery, E.M., Trotter, M.W., Hemberger, M., Smith, J.C., Bardwell, L., Moffett, A., and Pedersen, R.A. (2011) BRACHYURY and CDX2 mediate BMP-induced differentiation of human and mouse pluripotent stem cells into embryonic and extraembryonic lineages, *Cell Stem Cell*, **9**, 144–155, doi: 10.1016/j.stem.2011.06.015.
82. Aramaki, S., Hayashi, K., Kurimoto, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Saitou, M. (2013) A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants, *Dev. Cell*, **27**, 516–529, doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.001.
83. Sasaki, K., Yokobayashi, S., Nakamura, T., Okamoto, I., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohta, H., Moritoki, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Nakamura, S., Sekiguchi, K., Sakuma, T., Yamamoto, T., Mori, T., Woltjen, K., Nakagawa, M., Yamamoto, T., Takahashi, K., Yamanaka, S., and Saitou, M. (2015) Robust *in vitro* induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **17**, 178–194, doi: 10.1016/j.stem.2015.06.014.
84. Saitou, M., Barton, S.C., and Surani, M.A. (2002) A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice, *Nature*, **418**, 293–300, doi: 10.1038/nature00927.
85. Yamaji, M., Ueda, J., Hayashi, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Nakato, R., Yamada, Y., Shirahige, K., and Saitou, M. (2013) PRDM14 ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells, *Cell Stem Cell*, **12**, 368–382, doi: 10.1016/j.stem.2012.12.012.
86. Chen, D., Gell, J.J., Tao, Y., Sosa, E., and Clark, A.T. (2017) Modeling human infertility with pluripotent stem cells, *Stem Cell Res.*, **21**, 187–192, doi: 10.1016/j.scr.2017.04.005.
87. Singh, K., and Jaiswal, D. (2011) Human male infertility: a complex multifactorial phenotype, *Reprod. Sci.*, **18**, 418–425, doi: 10.1177/1933719111398148.
88. Bowles, J. (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice, *Science*, **312**, 596–600, doi: 10.1126/science.1125691.
89. MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P., and Petkovich, M. (2007) Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice, *Endocrinology*, **148**, 4560–4567, doi: 10.1210/en.2007-0492.
90. Abrao, M.S., Muzii, L., and Marana, R. (2013) Anatomical causes of female infertility and their management, *Int. J. Gynecol. Obstet.*, **123**, Suppl. 2, S18–S24, doi: 10.1016/j.ijgo.2013.09.008.
91. Anawalt, B.D. (2013) Approach to male infertility and induction of spermatogenesis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **98**, 3532–3542, doi: 10.1210/jc.2012-2400.
92. Rieger, D. (2012) Culture systems: physiological and environmental factors that can affect the outcome of human ART, *Methods Mol. Biol.*, **912**, 333–354, doi: 10.1007/978-1-61779-971-6_19.
93. Sharpe, R.M. (2010) Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **365**, 1697–1712, doi: 10.1098/rstb.2009.0206.
94. Handel, M.A., Eppig, J.J., and Schimenti, J.C. (2014) Applying “gold standards” to *in vitro*-derived germ cells, *Cell*, **157**, 1257–1261, doi: 10.1016/j.cell.2014.05.019.
95. Bourillot, P.Y., Aksoy, I., Schreiber, V., Wianny, F., Schulz, H., Hummel, O., Hubner, N., and Savatier, P. (2009) Novel STAT3 target genes exert distinct roles in the inhibition of mesoderm and endoderm differentiation in cooperation with Nanog, *Stem Cells*, **27**, 1760–1771, doi: 10.1002/stem.110.
96. Daheron, L., Opitz, S.L., Zaehres, H., Lensch, W.M., Andrews, P.W., Itskovitz-Eldor, J., and Daley, G.Q. (2004) LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **22**, 770–778, doi: 10.1634/stemcells.22-5-770.

MODERN TECHNOLOGIES DERIVING HUMAN PRIMORDIAL GERM CELLS *in vitro*

V. K. Abdyyev^{1*}, E. B. Dashinimayev^{2,3}, I. V. Neklyudova¹, E. A. Vorotelyak^{1,2,3}, and A. V. Vasilyev^{1,2}

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia

² Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

³ Pirogov Russian Research Medical University, 117997 Moscow, Russia

Received September 14, 2018

Revised November 20, 2018

Accepted November 20, 2018

Primordial germ cells are unique type of stem cells capable of giving rise to totipotent stem cells and ensure the fertility of an organism and the transfer of genome to the next generation. The research of primordial germ cells is an important field of developmental biology, which includes fundamental studies of early embryogenesis and developing technologies for obtaining primordial germ cells *in vitro* as promising treatment of infertility in the future. Considering ethical concerns related to studies on human embryos, the main approach in human primary germ cells research is *in vitro* studies on cells. In this review, we have considered the historical perspective of human primary germ cell researches *in vitro*, the main existing models and further outlooks and applications in medicine and science.

Keywords: primordial germ cells, PGCs, iPSCs, ESCs, VASA, PRDM1, human